

优雅蝟螽精子形成过程中 F-肌动蛋白的动态变化

周 娜¹, 常岩林^{1,*}, 王 莉²

(1. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002; 2. 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要: 为阐明 F-肌动蛋白在优雅蝟螽 *Gampsocleis gratiosa* Brunner von Wattenwyl 精子形成过程中的动态变化, 本研究利用微分干涉相衬技术和免疫荧光技术首次对优雅蝟螽精子形成过程中的 F-肌动蛋白进行了细胞定位, 利用透射电镜技术从超微水平观察了优雅蝟螽精子顶体复合体的结构。结果显示: 精子形成早期, F-肌动蛋白富集于亚顶体区域, 形态由“球状”转变为“棒锥状”; 精子形成中期, F-肌动蛋白呈“倒 Y 型”分布于亚顶体区域和细胞核前端两侧; 精子形成后期, 亚顶体区域的 F-肌动蛋白解聚消失, F-肌动蛋白呈“箭头状”, 仅分布于顶体复合体扩张的两翼中。F-肌动蛋白动态变化伴随着细胞核和精子头部的形态改变, F-肌动蛋白的动态装配在精子顶体复合体形态构建和细胞核的形变中起着重要的作用。本研究还发现未成熟的精子尾部有一些富含 F-肌动蛋白的细胞质微滴, 与精子形成过程中多余细胞质和细胞器的外排有关。F-肌动蛋白的动态变化研究为进一步阐明细胞骨架蛋白在昆虫精子形成过程中的功能和作用机制奠定了基础。

关键词: 优雅蝟螽; F-肌动蛋白; 精子形成; 顶体复合体; 细胞质微滴; 细胞器

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2012)04-0395-08

Dynamics of F-actin during spermiogenesis in *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae)

ZHOU Na¹, CHANG Yan-Lin^{1,*}, WANG Li² (1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China; 2. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: In order to understand the dynamics of F-actin during spermiogenesis in *Gampsocleis gratiosa* Brunner von Wattenwyl, we demonstrated the cellular localization of F-actin during spermiogenesis using differential interference contrast microscopy and immunofluorescence microscopy, and observed the ultrastructure of the acrosomal complex using transmission electron microscopy. The results show that F-actin is detected in the subacrosomal space at the early spermatid stage, with shape from globular to rod-cone-like. At the middle spermatid stage, F-actin is detected in the subacrosomal space and two sides of the nuclear forepart, and looks like an inverted Y. At the late spermatid stage, F-actin looks like an arrow only in the extension wings of the acrosomal complex. F-actin was depolymerized and disappeared, only being located at subacrosomal region at the middle spermatid stage. The results suggest that the dynamics of F-actin is associated with the shape of spermatid nucleus and sperm head, and the acrosomal architecture and nuclear morphogenesis are supported by a dynamic F-actin skeleton during spermiogenesis. In addition, we discovered some cytoplasm droplets in the tail of immature sperm. Immunocytochemical and ultrastructural analysis indicated that these cytoplasm droplets contain abundant F-actin. The F-actin of cytoplasm droplets can be involved in expelling redundant cytoplasm and organelles during spermiogenesis. This study on the dynamics of F-actin provides the foundation to clarify the function and mechanism of cytoskeletal proteins during insect spermiogenesis.

Key words: *Gampsocleis gratiosa*; F-actin; spermiogenesis; acrosomal complex; cytoplasm droplet; organelle

精子形成(spermiogenesis)是指减数分裂形成的形态和结构变化, 最终分化成有活力精子的精子细胞(spermatid)在精巢小管基部经过一系列(spermatozoa)的过程。精子形成过程涉及到众多生

基金项目: 国家自然科学基金项目(31093430, 31101632)

作者简介: 周娜, 女, 1987 年生, 山西运城人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫细胞与生理, E-mail: zhnhb@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: changylin@126.com

收稿日期 Received: 2011-12-31; 接受日期 Accepted: 2012-03-16

理变化和结构重组 (Chapman, 1998; Klowden, 2007)。精子细胞的逐步分化过程以及成熟精子重要生理功能的获得,在很大程度上依赖于细胞骨架的动态变化 (Spungin *et al.*, 1995; Howes *et al.*, 2001; Lie *et al.*, 2010)。

F-肌动蛋白 (F-actin) 即纤维状肌动蛋白 (fibrous actin), 也被称为微丝 (microfilament, MF) 或肌动蛋白丝 (actin filament), 是真核细胞中普遍存在的一种细胞骨架, 在进化上具有高度的保守性。鬼笔环肽 (phalloidin) 是从剧毒的鹅膏 *Amanita phalloides* 中提取的环肽, 可以与 F-肌动蛋白特异性结合。罗丹明 (rhodamine) 标记的鬼笔环肽是最常用的检测细胞内 F-肌动蛋白分布的荧光探针 (Karp, 2010)。

在体细胞中, 肌动蛋白几乎与所有形式的细胞运动有关 (Ayscough and Winder, 2004), 但生殖细胞中肌动蛋白的研究较少 (Xiao and Yang, 2007)。脊椎动物中, 蜥蜴 *Tropidurus itambere* 精子顶体复合体的顶体和亚顶体区域富含肌动蛋白 (Ferreira *et al.*, 2006), 哺乳类动物精子的头部、颈部以及尾部都含有肌动蛋白 (Clarke *et al.*, 1982; Aumüller and Seitz, 1988; Liu *et al.*, 1999)。无脊椎动物中, 贻贝 *Mytilus*、赛爪参 *Thyone*、绿海胆 *Strongylocentrotus droenachiensis* 精子形成过程中肌动蛋白的作用也已有报道 (Tilney and Inoué, 1982; Tilney *et al.*, 1987; Marks *et al.*, 2008)。肌动蛋白在昆虫精子形成中的作用研究报道很少, 果蝇 *Drosophila* 精子形成过程中, 成熟精子头部通过 F-肌动蛋白相互粘附形成紧密的精子束, 以此调控成熟精子向储精囊的释放 (Noguchi and Miller, 2003; Noguchi *et al.*, 2006, 2008; Desai *et al.*, 2009)。家蚕 *Bombyx mori* 精子形成过程中, 精子束的“蠕动挤压 (peristaltic squeezing)”过程伴随着肌动蛋白的动态变化 (Sahara and Kawamura, 2004)。直翅目昆虫中, 西班牙学者曾对 1 种螽斯 *Platycle albopunctata* 精子顶体复合体的结构与细胞骨架作了研究, 发现顶体复合体的翼状结构中分布有肌动蛋白和微管蛋白, 顶体被 1 层明显的细胞外物质覆盖 (Guerra and Esponda, 1999)。

优雅蝟螽 *Gampsocleis gratiosa* Brunner von Wattenwyl, 俗称蝟螽, 其精子结构复杂, 顶体复合体体积大, 包含 1 个顶端囊泡和 2 个大的翼状扩张结构, 形状似箭头 (王莉等, 2010; 常岩林等, 2011), 是研究昆虫精子形成过程的理想材料。本

研究利用微分干涉相衬技术、免疫荧光技术以及透射电镜技术, 对优雅蝟螽精子形成过程中的 F-肌动蛋白进行了细胞定位, 旨在阐明骨架蛋白在蝟螽精子形成过程中的动态分布特点, 为进一步研究骨架蛋白在昆虫精子形成过程中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试虫与试剂

1.1.1 试虫: 研究所用的优雅蝟螽 *G. gratiosa* 活虫于 2011 年 6 月中旬–9 月中旬采自河北省顺平县野外生境。野外采集的活虫, 带回室内单笼单头暂养数天, 选取发育良好的雄性成虫解剖。

1.1.2 试剂: 多聚甲醛、聚-L-赖氨酸氢溴酸盐、DAPI (4', 6-二脒基-2-苯基吡啶)、鬼笔环肽-罗丹明 (phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate) 均购买于 Sigma 公司; Triton X-100、PBS (磷酸盐缓冲液); PB (磷酸缓冲液)、戊二醛、四氧化锇、环氧树脂 Epon812、MNA (甲基内次甲基四氢苯二甲酸酐)、DDSA (十二烷基琥珀酸酐)、DMP-30 [2, 4, 6-三(二甲氨基甲基)苯酚]、醋酸铀、柠檬酸铅、直翅目昆虫生理盐水 (NaCl 6.8 g, MgCl₂ · 6H₂O 0.2 g, CaCl₂ 0.2 g, KCl 0.2 g, NaHCO₃ 0.15 g, 葡萄糖 7.7 g, H₂O 1 000 mL)。

1.2 免疫荧光制片与观察

活体解剖发育良好的雄性成虫 (15 头), 迅速分离出精巢并置于盛有直翅目昆虫生理盐水的 EP 管中, 研磨棒轻轻研磨, 低速短时离心去除较大组织块, 取上清液, 1 600 r/min 再次离心收集细胞沉淀; 将收集的细胞转移至新鲜的 4% 多聚甲醛溶液中, 4℃ 固定 1 h, PBS 漂洗 3 次; 通过镜检调节细胞悬浮液浓度, 吸取少量浓度适中的细胞悬浮液涂抹在已用 0.1% 的多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 自然干燥约 10 min; 在材料处滴加 1% 的 Triton X-100, 将载玻片置于湿盒中, 室温处理 45 min, PBS 漂洗 3 次; 滴加 0.01 μmol/L 的鬼笔环肽-罗丹明, 湿盒中室温孵育 45 min, PBS 漂洗 3 次; 滴加 0.001% 的 DAPI, 湿盒中 4℃ 避光孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次; 甘油-PBS 封片, 在 Olympus BX51 显微镜下, 利用 DIC 诺马斯基微分干涉与荧光分别观察、分别拍照, 拍照后的图像用 Adobe Photoshop CS3 叠加。对照组用 PBS 分别代替鬼笔环肽-罗丹明、DAPI 进行孵育。以上实验共重复 15 次。

1.3 透射电镜制片与观察

活体解剖发育良好的雄性成虫 5 头，取出精巢，迅速切割成 1 mm^3 的小块，置于 2.5% 的戊二醛溶液中，4℃ 固定 1 h，PB 漂洗 3 次，转至四氧化锇溶液中，4℃ 固定 2 h，PB 漂洗 3 次；酒精梯度脱水后，转至环氧树脂 Epon812 中包埋。

Reichert-Jung 超薄切片机切片，厚度约为 70 nm，捞在 200 或 300 目的铜网上，使用醋酸铀和柠檬酸铅进行双重染色，利用 JEM-100SX 透射电子显微镜观察并拍照。

2 结果

2.1 精子形成过程中 F-肌动蛋白在精子头部的荧光定位

顶体复合体的形成和细胞核的形变是精子形成过程中的 2 个主要事件，综合微分干涉观察结果和荧光定位结果，依据精子头部整体特征、细胞核以及顶体复合体形态将优雅蝨蚤精子形成过程分为 3 个时期：①精子形成早期（图 1）；②精子形成中期（图 2）；③精子形成后期（图 3）。

（图 2）；③精子形成后期（图 3）。

精子形成早期阶段，精子头部整体为椭圆形或长椭圆形，细胞核的形状与精子头部外形一致（图 1：A，B，E，F，I，J）；顶体复合体两翼的骨架已经出现（图 1：A，E，I），F-肌动蛋白主要分布在细胞核前端，呈“球状”（图 1：C，D，G，H）。随着细胞核的延伸变形，F-肌动蛋白的表达量增加，且逐渐呈“棒锥状”（图 1：K，L）。在这个阶段，顶体复合体两翼的骨架部位没有 F-肌动蛋白的分布（图 1：A，D，E，H，I，L）。

精子形成中期阶段，精子头部整体为梭形（图 2：A，E，I），细胞核为粗棒槌状（图 2：B，F，J）；顶体复合体两翼的骨架明显可见（图 2：A，E，I），F-肌动蛋白呈“倒 Y 型”分布在细胞核前端和前端两侧（图 2：C，D，G，H）。伴随着细胞核的进一步浓缩，F-肌动蛋白“倒 Y 型”的“l”表达量逐渐减弱（图 2：K，L）。在这个阶段，顶体复合体两翼的骨架部位有 F-肌动蛋白的分布，但是 F-肌动蛋白的分布与顶体复合体两翼的骨架不完全重合（图 2：A，D，E，H，I，L）。

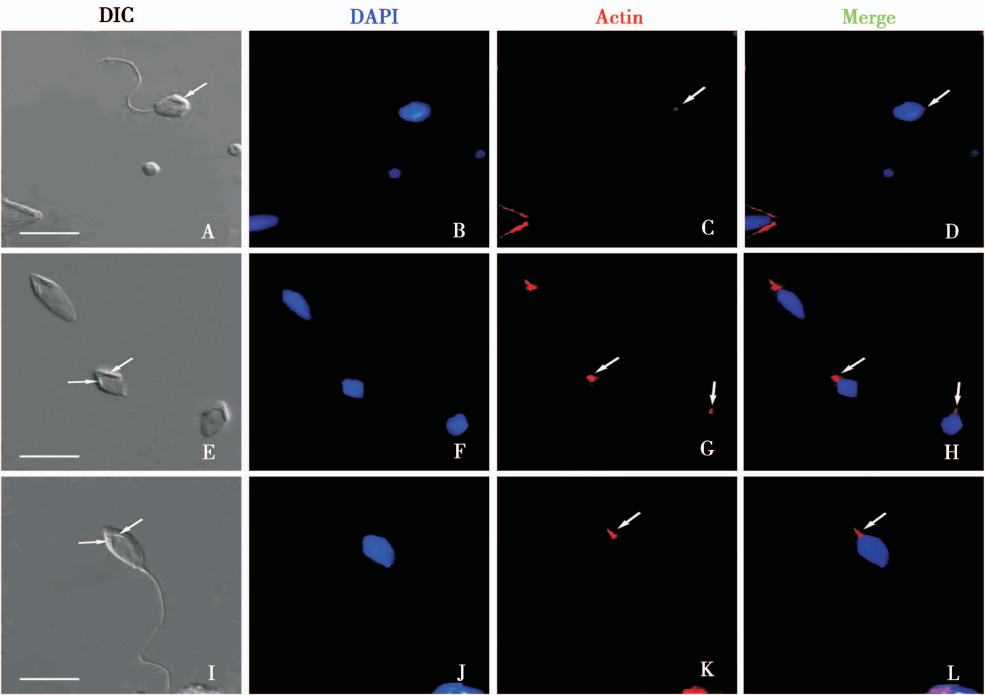


图 1 优雅蝨蚤雄性成虫精子形成早期阶段 F-肌动蛋白的细胞定位

Fig. 1 The localization of F-actin at the early stage of spermiogenesis in male adults of *Gampsocleis graptosa*

A，E，I：早期精子微分干涉图像 DIC image of early spermatids；B，F，J：早期精子细胞核（蓝色），DAPI 标记 Nucleus in early spermatids (blue)，DAPI marked；C，G，K：早期精子头部 F-肌动蛋白（红色），鬼笔环肽-罗丹明标记 The location of F-actin in early spermatid heads (red)，phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate marked；D，H，L：分别是 B 和 C，F 和 G，J 和 K 的叠加图 B and C，F and G，and J and K are merged，respectively. A - D，E - H，I - L：同一视野中的早期精子 The early spermatids in the same field. A，E 和 I 图箭头所指为顶体复合体两翼的骨架，其余箭头所指为 F-肌动蛋白，精子头部 F-肌动蛋白呈球状或棒锥状 Arrows in A，E and I indicate cytoskeleton in the acrosomal complex wings，while arrows in the rest figures indicate F-actin. F-actin in spermatid head looks globular or rod-cone-like. 标尺 Scale bars = 30 μm .

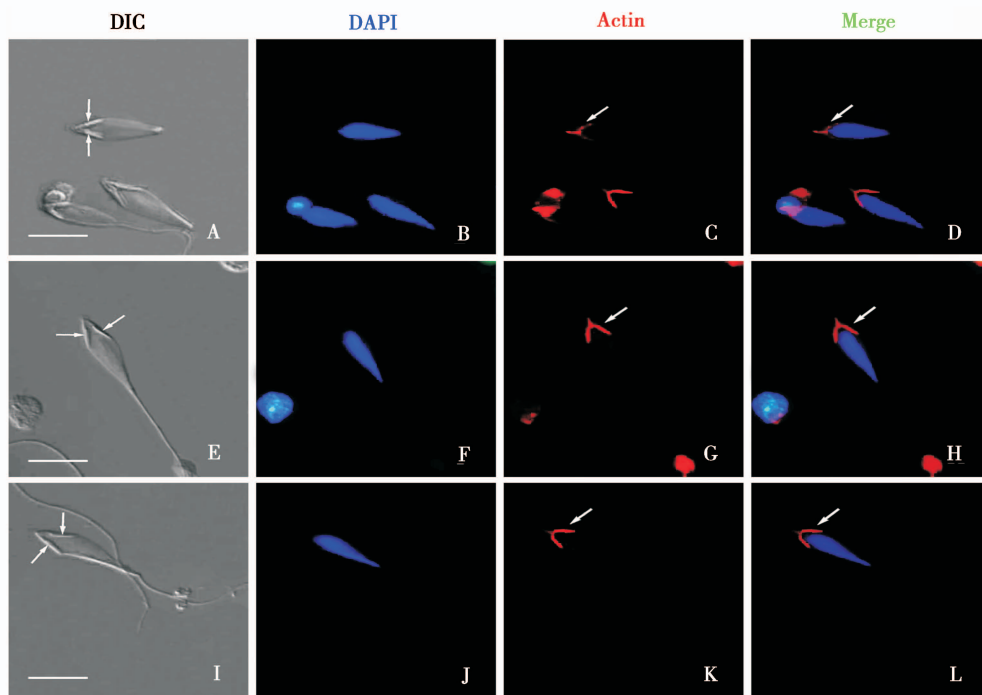


图 2 优雅蝟蝥雄性成虫精子形成中期阶段 F-肌动蛋白的细胞定位

Fig. 2 The localization of F-actin at the middle stage of spermiogenesis in male adults of *Gampsocleis gratiosa*

A, E, I: 中期精子微干涉图像 DIC image of middle spermatids; B, F, J: 中期精子细胞核(蓝色), DAPI 标记 Nucleus in middle spermatids (blue), DAPI marked; C, G, K: 中期精子头部 F-肌动蛋白(红色), 鬼笔环肽-罗丹明标记 The location of F-actin in middle spermatid heads (red), phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate marked; D, H, L: 分别是 B 和 C, F 和 G, J 和 K 的叠加图 B and C, F and G, and J and K are merged, respectively. A – D, E – H, I – L: 同一视野中的中期精子 The middle spermatids in the same field. A, E 和 I 图箭头所指为顶体复合体两翼的骨架, 其余箭头所指为 F-肌动蛋白, 精子头部 F-肌动蛋白的变化呈“倒 Y 型” Arrows in A, E and I indicate cytoskeleton in the acrosomal complex wings, while arrows in the rest figures indicate F-actin. F-actin in spermatid head looks like an inverted Y. 标尺 Scale bars = 30 μm .

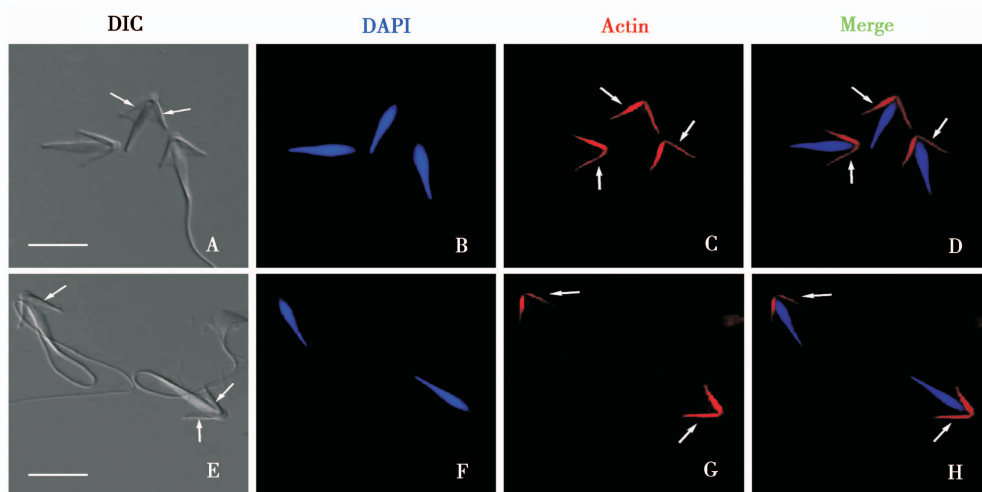


图 3 优雅蝟蝥雄性成虫精子形成后期阶段 F-肌动蛋白的细胞定位

Fig. 3 The localization of F-actin at the late stage of spermiogenesis in male adults of *Gampsocleis gratiosa*

A, E: 后期精子微干涉图像 DIC image of late spermatids; B, F: 后期精子细胞核(蓝色), DAPI 标记 Nucleus in late spermatids (blue), DAPI marked; C, G: 后期精子头部 F-肌动蛋白(红色), 鬼笔环肽-罗丹明标记 The location of F-actin in late spermatid heads (red), phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate marked; D, H: 分别是 B 和 C, F 和 G 的叠加图 B and C, and F and G are merged, respectively. A – D, E – H: 同一视野中的后期精子 The late spermatids in the same field. A 和 E 图箭头所指为顶体复合体两翼的骨架, 其余图中箭头所指为 F-肌动蛋白, 精子头部 F-肌动蛋白呈箭头状 Arrows in A and E indicate cytoskeleton in the acrosomal complex wings, while arrows in the rest figures indicate F-actin. F-actin in spermatid head looks like an arrow. 标尺 Scale bars = 30 μm .

精子形成后期阶段,精子头部整体为箭状(图 3: A,E),细胞核呈细棒槌状(图 3: B,F);顶体复合体两翼的骨架似箭状(图 3: A,E),F-肌动蛋白呈“箭头状”分布于顶体复合体两翼骨架部位的结构中(图 3: C,D,G,H)。在这个阶段,F-肌动蛋白的分布与顶体复合体两翼的骨架结构基本重合(图 3: A,D,E,H)。

综合以上结果,优雅蝨螽精子顶体复合体形成过程中,F-肌动蛋白的变化经历了 4 个时期:①“球

状”期(图 1: D,H);②“棒锥状”期(图 1: L);③“倒 Y 型”期(图 2: D,H,L);④“箭头状”期(图 3: D,H)。

2.2 顶体复合体超微结构变化

优雅蝨螽早期精子被 1 层不规则的质膜包裹,精子头部细胞核开始延伸,染色质凝集程度较低,电子密度中等。顶体复合体已明显形成,顶体以及顶体本体清晰可见(图 4: A ~ C);顶体浓厚致密,位于细胞核前端包裹着细胞核,顶体本体处可见纤

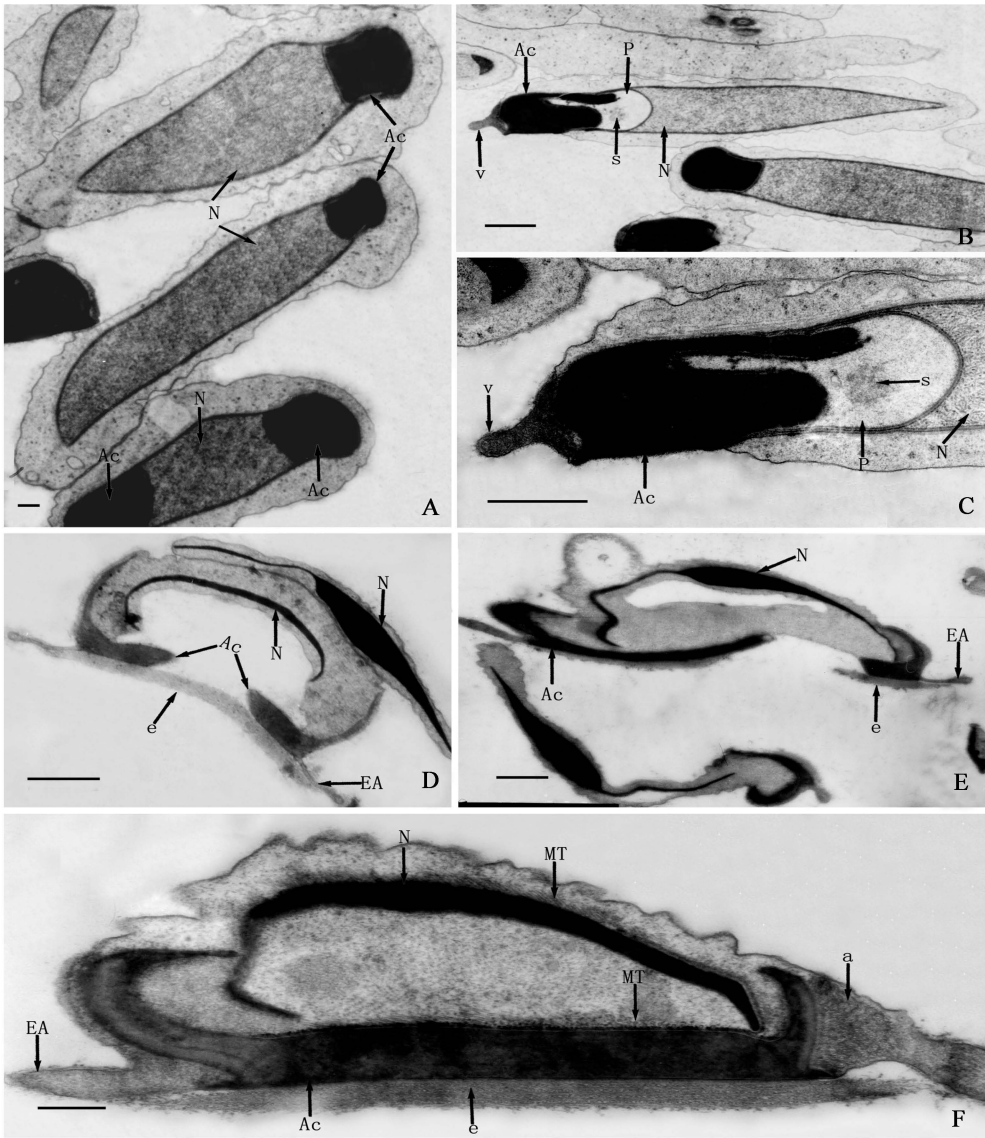


图 4 优雅蝨螽精子顶体复合体形成过程电镜图

Fig. 4 Transmission electron micrograph of the formation of acrosomal complex in spermatids of *Campsocleis gratiosa*

A: 早期精子头部切面 The section of early spermatid head; B: 早期精子纵切图 Longitudinal-section of early spermatid; C: B 图的局部放大 Detail view of B; F: 中期精子头部横切图 Cross-section of the mid spermatid head; D, E 后期精子头部横切图 Cross-section of the late spermatid head. Ac: 顶体 Acrosome; a: 致密物质 Dense materials; EA: 顶体外层 Extra-acrosomal layer; e: 胞外覆盖物 Extracellular coat; MT: 微管 Microtubules; N: 细胞核 Nucleus; P: 顶体本体 Perforatorium; s: 亚顶体物质 Subacrosomal materials; v: 顶端囊泡 Apical vesicle. 标尺 Scale bars = 1 μm .

维状的亚顶体物质,同时顶体前端,细胞质膜凸起形成1个囊泡(图4:B,C)。随着精子细胞的发育,细胞核被拉长,核内染色质进一步凝集,电子密度增高;精子头部横切可见细胞核呈囊状,外周围绕有大量的微管;顶体外围包裹有1层致密的物质,内侧有分布着大量微管;顶体与质膜之间有一些致密的纤维物质(图4:F)。成熟精子头部横切明显可见顶体复合体包裹着细胞核,细胞核呈囊状或具柄辣椒状,电子密度高。顶体外围包裹的致密物质减少,致密程度稍弱(图4:D,E)。

2.3 未成熟精子尾部的细胞质微滴

优雅蝨螽精子成熟之前,尾部鞭毛上存在一些数量不等圆珠状的结构,即细胞质微滴(cytoplasm droplets)(图5:A,B)。免疫荧光标记结果表明,细胞质微滴富含大量的F-肌动蛋白(图5:B,D)。同时超微结构显示,细胞质微滴的横切面比成熟精子鞭毛横切面的直径约大3倍,并且内部包裹着大量的细胞质、核糖体以及一些纤维状物质;线粒体衍生体和轴丝周围包围着大量微管(图5:C)。

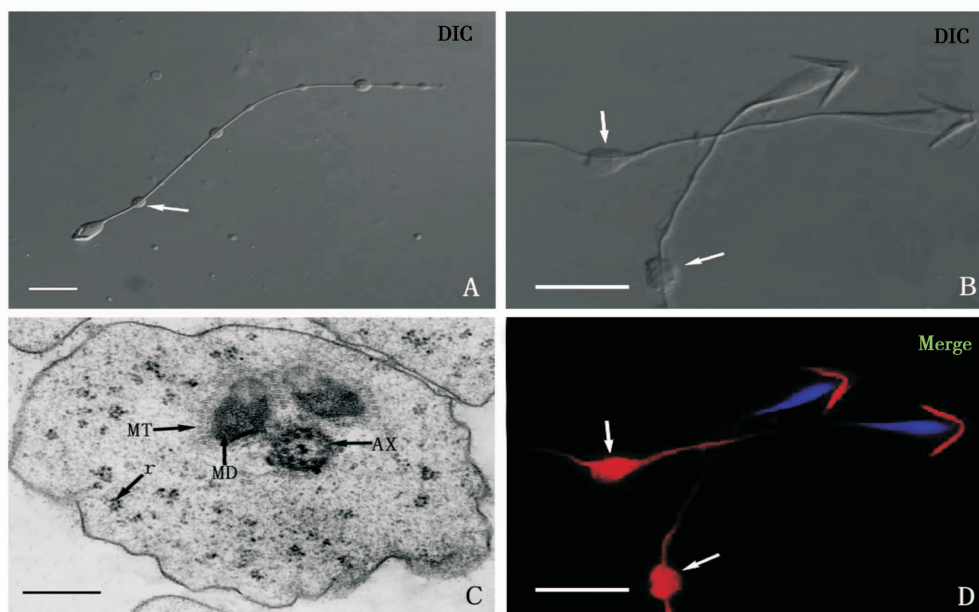


图5 优雅蝨螽未成熟精子尾部细胞质微滴

Fig. 5 Cytoplasm droplets in immature spermatid tail of *Gampsocleis gratioiosa*

A, B: 未成熟精子微分干涉图像 DIC image of immature spermatid; C: 精子尾部细胞质微滴透射电镜横切图 Cross-section of cytoplasm droplet in spermatids tail by TEM; D: 免疫荧光标记细胞核(蓝色)和F-肌动蛋白(红色)的叠加图 Nucleus (blue) marked with DAPI and F-actin (red) marked with phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate are fused. B, D: 同一视野的未成熟精子 Immature spermatids in the same field. AX: 轴丝 Axoneme; MD: 线粒体衍生体 Mitochondrial derivatives; MT: 微管 Microtubules; r: 核糖体 Ribosome. A, B, D 图中箭头所示精子尾部细胞质微滴 Arrows indicate cytoplasm droplets in spermatids tail in A, B and D. 标尺 Scale bars: A, B, D = 30 μm ; C = 0.3 μm .

3 讨论

3.1 顶体复合体形成过程中F-肌动蛋白的动态变化

直翅目是昆虫纲古老的类群之一,其精子发生保持着较为原始的状态。成熟精子均为有鞭毛精子,分为头部、颈部和尾部。精子头部顶体复合体结构复杂,由顶体外层(extra-acrosomal layer)、顶体本体(acrosome)和顶体(perforatorium)组成(Baccetti, 1987; 奚耕思等, 1999)。有关直翅目顶

体复合体复杂结构与细胞骨架的相关报道甚少,可能是因为蝗虫和蟋蟀精子顶体复合体体积较小,难以进行荧光定位观察。螽斯顶体复合体结构复杂,而且体积大,优雅蝨螽精子顶体复合体扩张的两翼长度约15 μm (Baccetti, 1987; 杜喜翠和石福明, 2005; 常岩林等, 2011),在光学显微镜下形变过程较易观察。

本研究中,在同一张载玻片的材料上,使用鬼笔环肽-罗丹明和DAPI,依次标记精子细胞内的F-肌动蛋白和细胞核。DIC 诺马斯基微分干涉与荧光对同一视野观察、拍照。通过对比两者图像,得到

了显微结构层次的肌动蛋白动态变化过程。同时结合超微结构,我们发现:优雅蝟螽精子顶体复合体形成过程中,细胞核由圆形→椭圆形→粗棒槌状→细棒槌状;F-肌动蛋白由球状→棒锥状→倒Y型→箭头状;顶体复合体形态构建过程中,F-肌动蛋白动态的装配和去装配伴随着细胞核的形变。

肌动蛋白在精子形成过程中的作用已有一些报道(Clarke *et al.*, 1982; Aumüller and Seitz, 1988; Liu *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2006; Xiao and Yang, 2007)。哺乳动物精子亚顶体区域存在一个富含F-肌动蛋白和角蛋白细纤维的盘状结构,即顶体构架体(acroplaxome)。在精子形成过程中,顶体构架体参与顶体复合体的形成以及头部形变;在精子拉伸过程中,这些环状结构将顶体前缘和细胞核被膜紧密连接在一起,保证精子形变过程中顶体始终处于细胞核的一端(Kierszenbaum *et al.*, 2003; Kierszenbaum and Tres, 2004)。优雅蝟螽精子形成的早期和中期,亚顶体区域的F-肌动蛋白清晰可见,这很有可能与哺乳动物精子的顶体构架体作用相似。我们推测,F-肌动蛋白作为优雅蝟螽精子顶体复合体中主要的骨架成分,其动态变化不仅在顶体复合体形态构建中起着重要的作用,而且在细胞核的形变过程中起到支架作用。

哺乳动物精子形成过程中,精子细胞产生众多肌动蛋白和微管蛋白,在一些分子马达蛋白驱动和其他非分子马达蛋白辅助作用下进行物质转运(Kierszenbaum *et al.*, 2011)。优雅蝟螽精子细胞形态变化过程中,初始富集在亚顶体区域的F-肌动蛋白,通过一个“倒Y型”轨迹慢慢转移至顶体两翼,同时超微结构中顶体周围的微管也清晰可见。我们认为F-肌动蛋白和微管蛋白在优雅蝟螽精子形变过程也参与物质转运。

在一些无脊椎动物精子的亚顶体区域,肌动蛋白纤维形成一个棒状结构,即顶体。受精过程中形成顶体突,当精子接触到卵膜的时候,发生顶体反应的同时,顶体突向外凸起给予外援力量(Tilney and Inoué, 1982; Tilney *et al.*, 1987),最终完成受精作用。优雅蝟螽成熟精子扩张的两翼中富集的F-肌动蛋白可能类似于无脊椎动物亚顶体区域的棒状结构,在受精过程起外源力的作用。

3.2 未成熟精子尾部的细胞质微滴

精子形成包括精子细胞核的浓缩、头部顶体复合体、尾部鞭毛等结构的分化和形成,以及细胞核和轴丝周围微管的消失、细胞内多余细胞质和细胞

器的丢弃(Chapman, 1998)。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 精子个性化(individualization)过程中,在细胞核末端形成一个富含F-肌动蛋白的锥体结构(actin cone),随后慢慢向尾部移动,将多余的细胞质和细胞器排挤出去,形成一个大的垃圾包最终丢弃(Noguchi and Miller, 2003; Noguchi *et al.*, 2006, 2008),在家蚕中也发现类似现象(Sanara and Kawamura, 2004)。螽斯精子发生过程中,精子鞭毛部分区域出现细胞质膨大现象较普遍(Baccetti, 1987; 杜喜翠和石福明, 2005),螽斯 *Platypleura albopunctata* 精子尾部也同样存在细胞质微滴,且富含大量的肌动蛋白(Guerra and Esponda, 1999),但未提及其作用。优雅蝟螽成熟精子尾部鞭毛上未见细胞质微滴(王莉等, 2010; 常岩林等, 2011),而未成熟精子尾部鞭毛具有数量不等的细胞质微滴。结合超微结构,我们认为优雅蝟螽未成熟精子尾部细胞质微滴的作用与精子形成过程相关,且与果蝇精子个性化过程中的微丝锥作用相似,在精子形成过程中将多余的细胞质和细胞器排挤出去。

3.3 小结

本研究首次研究优雅蝟螽精子形成过程中F-肌动蛋白的动态变化。优雅蝟螽精子顶体复合体形成过程中,F-肌动蛋白的分布与微分干涉相衬显微镜下观察到的精子形成过程中头部骨架结构并不完全重合。精子形成早期,顶体复合体两翼的骨架已经出现,但顶体复合体两翼的骨架部位没有观察到F-肌动蛋白的分布;精子形成中期,顶体复合体两翼的骨架部位有F-肌动蛋白的分布,但与顶体复合体两翼的骨架不完全重合;直到精子形成后期,F-肌动蛋白的分布与顶体复合体两翼的骨架才基本重合。因此我们推测,优雅蝟螽精子顶体复合体中除了F-肌动蛋白外,可能还有其他的骨架蛋白成分,在顶体复合体形态构建中同样起重要的作用,骨架蛋白在精子形成过程中的功能及作用机制仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- Aumüller G, Seitz J, 1988. Immunocytochemical localization of actin and tubulin in rat testis and spermatozoa. *Histochemistry*, 89: 261–267.
- Ayscough KR, Winder SJ, 2004. Two billion years of actin. *EMBO Rep.*, 5(10): 947–952.
- Baccetti B, 1987. Spermatozoa and phylogeny in orthopteroid insects. In: Baccetti B ed. *Evolutionary Biology of Orthopteroid Insects*. Ellis Horwood Limited, London. 12–112.

- Chang YL, Wang L, Guo MS, Zhang XX, 2011. Sperm ultrastructure of *Gampsocleis sedakovii* and *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Acta Zootax. Sin.*, 36(3): 664–669. [常岩林, 王莉, 郭明申, 张小霞, 2011. 暗褐蝈螬与优雅蝈螬精子超微结构的比较研究. *动物分类学报*, 36(3): 664–669]
- Chapman RF, 1998. *The Insects: Structure and Function*. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge. 276–288.
- Clarke GN, Clarke FM, Wilson S, 1982. Actin in human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 26: 319–327.
- Desai BS, Shirolkar S, Ray K, 2009. F-actin-based extensions of the head cyst cell adhere to the maturing spermatids to maintain them in a tight bundle and prevent their premature release in *Drosophila* testis. *BMC Biol.*, 7: 19.
- Du XC, Shi FM, 2005. A comparison of spermatozoa of *Gampsocleis sinensis* and *Tettigonia chinensis* in Tettigoniidae (Orthoptera, Tettigoniodea). *Acta Zootax. Sin.*, 30(3): 461–466. [杜喜翠, 石福明, 2005. 中华蝈螬与中华螬斯精子超微结构研究(直翅目, 螬斯总科). *动物分类学报*, 30(3): 461–466]
- Ferreira A, Mehanna M, Dolder H, 2006. Ultrastructural immunocytochemical evidence for actin in the acrosomal complex during spermiogenesis of the lizard *Tropidurus itambere* (Rodrigues, 1987) (Reptilia: Tropiduridae). *Caryologia*, 59(3): 213–219.
- Guerra R, Esponda P, 1999. Structure, cytoskeleton, and development of the acrosome of *Platycleis albopunctata* (Orthoptera: Tettigoniidae). *J. Morphol.*, 242: 47–56.
- Howes EA, Hurst SM, Jones R, 2001. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. *J. Androl.*, 22(1): 62–72.
- Karp G, 2010. *Cell and Molecular biology: Concepts and Experiments*. 6th ed. John Wiley and Sons, Inc., Honoken. 351–378.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL, 2003. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol. Biol. Cell*, 14: 4628–4640.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL, 2011. Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. *Spermatogenesis*, 1(3): 221–230.
- Kierszenbaum AL, Tres LL, 2004. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol. Cytol.*, 67(4): 271–284.
- Klowden MJ, 2007. *Physiological Systems in Insects*. 2nd ed. Academic Press, San Diego. 203–213.
- Lie PPY, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY, 2010. Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 365: 1581–1592.
- Liu DY, Martic M, Clarke GN, Dunlop ME, Baker HWG, 1999. An important role of actin polymerization in the human zona pellucida-induced acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.*, 5(10): 941–949.
- Marks JA, Biermann CH, Eanes WF, Kryvi AN, 2008. Sperm polymorphism within the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*: divergence between Pacific and Atlantic Oceans. *Biol. Bull.*, 215: 115–125.
- Noguchi T, Lenartowska M, Miller KG, 2006. Myosin VI stabilizes an actin network during *Drosophila* spermatid individualization. *Mol. Biol. Cell*, 17: 2559–2571.
- Noguchi T, Lenartowska M, Rogat AD, Frank DJ, Miller KG, 2008. Proper cellular reorganization during *Drosophila* spermatid individualization depends on actin structures composed of two domains, bundles and meshwork, that are differentially regulated and have different functions. *Mol. Biol. Cell*, 19: 2363–2372.
- Noguchi T, Miller KG, 2003. A role for actin dynamics in individualization during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 130: 1805–1816.
- Sahara K, Kawamura N, 2004. Roles of actin networks in peristaltic squeezing of sperm bundles in *Bombyx mori*. *J. Morphol.*, 259: 1–6.
- Spungin B, Margalit L, Breitbart H, 1995. Sperm exocytosis reconstructed in cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J. Cell Sci.*, 108: 2525–2535.
- Tilney LG, Inoué S, 1982. Acrosomal reaction of *Thyone* sperm. II. The kinetics and possible mechanism of acrosomal process elongation. *J. Cell Biol.*, 93: 820–827.
- Tilney LG, Tilney MS, Fukni Y, DeRosier DJ, 1987. Movements of the actin filament bundle in *Mytilus* sperm: a new mechanism is proposed. *J. Cell Biol.*, 104: 981–993.
- Wang L, Chang YL, Feng XL, Shi FM, 2010. Microscopic observation of spermatodesms of *Gampsocleis gratiosa* and *G. sedakovii* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Acta Entomol. Sin.*, 53(5): 596–600. [王莉, 常岩林, 冯晓丽, 石福明, 2010. 优雅蝈螬与暗褐蝈螬精子束的显微观察. *昆虫学报*, 53(5): 596–600]
- Xi GS, Yang YH, Zheng ZM, 1999. Ultrastructure of acrosome complex formation in cricket sperm. *Acta Zool. Sin.*, 45(4): 462–465. [奚耕思, 杨月红, 郑哲民, 1999. 蟋蟀精子顶体复合体形成的超微结构. *动物学报*, 45(4): 462–465]
- Xiao X, Yang WX, 2007. Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 8(7): 498–506. (责任编辑: 武晓颖)